




**PRODUCTION OF FRUCTOSE-CONTAINING OLIGOSACCHARIDE**

**Patent number:** JP4091795  
**Publication date:** 1992-03-25  
**Inventor:** FUJITA TAKATERU; HARA KOZO; HASHIMOTO HITOSHI; KITAHATA SUMIO  
**Applicant:** ENSUIKO SUGAR REFINING  
**Classification:**  
**- international:** C12N9/26; C12P19/12; C12P19/24; C12N9/26; C12P19/00; (IPC1-7): C07H3/06; C12N9/10; C12P19/14; C12P19/18  
**- european:** C12N9/26; C12P19/12; C12P19/24  
**Application number:** JP19900207582 19900807  
**Priority number(s):** JP19900207582 19900807

**Also published as:**

 EP0470331 (A)  
 US5089401 (A)  
 EP0470331 (B)

**Report a data error here**

**Abstract of JP4091795**

**PURPOSE:** To produce a fructose-containing oligosaccharide by acting beta- furactofuranosidase on either one of saccharide, raffinose and stachyose in the presence of aldose or ketose.

**CONSTITUTION:** Either one among saccharide, raffinose and stachyose (donor molecule) is treated with beta-furactofuranosidase in the presence of aldose or ketose (receptor molecule) to produce the fructose containing oligosaccharide. Production of beta-furactofuranosidase is preferably carried out by adding the above-mentioned microorganism to a selected culture medium and subjecting the microorganism to submerged culture or shake culture from 10 hr to 5 day while each keeping pH to neutral to slight alkaline and temperature to about 20-45 deg.C. The aimed fructose-containing oligosaccharide is preferably obtained by reacting a substrate solution containing the receptor molecule and donor molecule with beta furactofuranosidase.

---

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-91795

⑤ Int. Cl.<sup>5</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 平成4年(1992)3月25日  
 C 12 P 19/14 Z 8214-4B  
 19/18 8214-4B  
 // C 07 H 3/06  
 C 12 N 9/10 7823-4B  
 (C 12 N 9/10  
 C 12 R 1:06)

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全12頁)

⑭ 発明の名称 フラクトース含有オリゴ糖の製造法

⑮ 特 願 平2-207582

⑯ 出 願 平2(1990)8月7日

⑰ 発 明 者 藤 田 孝 輝 大阪府大阪市城東区森の宮2丁目 森の宮第2団地6-308  
 ⑰ 発 明 者 原 耕 三 神奈川県横浜市金沢区並木2丁目6-3-104  
 ⑰ 発 明 者 橋 本 仁 神奈川県鎌倉市今泉台4-31-10  
 ⑰ 発 明 者 北 畑 寿 美 雄 大阪府泉南郡熊取町野田621-440  
 ⑱ 出 願 人 塩水港精糖株式会社 神奈川県横浜市鶴見区大黒町13番46号  
 ⑲ 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

明 細 書

## 1. 発明の名称

フラクトース含有オリゴ糖の製造法

## 2. 特許請求の範囲

1. アルドースおよびケトースの存在下、ショ糖、ラフィノースおよびスタキオースの中のいずれかに下記の性質を有するβ-フラクトフラノシダーゼを作用させることを特徴とするフラクトース含有オリゴ糖の製造法。

(1) 本酵素は受容体として各種単糖、糖アルコール、アルキルアルコール、配糖体、オリゴ糖等の存在下、ショ糖に作用させると、フラクトシル基を受容体分子に転移させ、その受容体特異性は極めて広い。

(2) 本酵素はショ糖、エルロース、ネオケストース、キシルシュクロース、ラフィノース、スタキオースをよく分解するが、1-ケストース、ニストース、イヌロビオース、レバンビオースには作用しにくい。

(3) 本酵素は40℃にてpH 6.5~6.8が至適

であり、pH 5.5~10で安定である。

(4) 本酵素はpH 6.5において至適温度は55℃であり、60℃でも70%以上の残存活性を示す。

(5) 本酵素は銀、水銀、亜鉛、銅、錫の存在で阻害を受ける。

(6) 本酵素は分子量52,000±2,500および58,000±2,500(SDS-ディスクゲル電気泳動およびゲル濾過法による)の2つからなる。

(7) 本酵素の等電点はそれぞれpH 4.3および4.6(アンフォライン電気泳動法による)である。

2. フラクトース含有オリゴ糖が請求項1記載の酵素の受容体となり得るアルドースおよびケトースを含むものである請求項1記載の方法。

3. フラクトース含有オリゴ糖がキシルシュクロース、ガルシュクロース、ラクトシュクロース、イソマルトシュクロース、エルロース、アラビノシルフラクトシド、フコシルフラクトシドおよびソルボシルフラクトシドの中のいずれかである請

求項2記載の方法。

### 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、フラクトース含有オリゴ糖の製造法に関し、詳しくは糖転移活性の強い酵素を用いて効率よく安価にフラクトース含有オリゴ糖を製造する方法に関する。

(従来技術および発明が解決しようとする課題)

近年、健康志向の増大にともない、グルコシル基あるいはフラクトシル基転移酵素を用いた種々の生理活性を有するオリゴ糖、有用配糖体の合成等の研究が盛んに行なわれている。カップリングシュガー<sup>®</sup>、フラクトオリゴ糖、バラチノース、 $\alpha$ -グルコシルステビオサイドなどが虫歯にならない、またビフィズス菌増殖因子等の性質をもつものとして実用化された例である。

現在、フラクトシル基転移酵素としてはバチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)の生産するレバンシュクララーゼおよびアスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*)、ペニシリウム・オキザリ

クム(*Penicillium oxalicum*)、ペニシリウム・フリクエンタンス(*Penicillium frequentans*)、ペニシリウム・エスピー(*Penicillium sp.*) K25 などがびの生産する $\beta$ -フラクトフラノシダーゼが知られている。このうちレバンシュクララーゼの糖転移作用を利用して合成されるキシロシルフラクトシド、イソマルトシルフラクトシドは抗う蝕性の性質を有し、さらにラクトシルフラクトシドはビフィズス菌増殖因子としての活性を有していることより、これらのオリゴ糖は機能性糖質として実用化される可能性を秘めている。しかし、これらのオリゴ糖の生産に用いられているレバンシュクララーゼはショ糖によって誘導されるため、培地にショ糖の添加が不可欠であり、このため培養液にレバンを作り、粘度が高くなるため扱いにくい。また、酵素の生産性も低く、さらに耐熱性が低いなどの問題点が指摘されている。また、従来のかびの生産する $\beta$ -フラクトフラノシダーゼは菌体内酵素であり、受容体特異性も狭いという欠点を持っている。

本発明者らは、受容体特異性が広く、糖転移活性の強い $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを菌体外に生産する微生物アルスロバクター・エスピー K-1 (FERM P-10736)を見出し、該微生物を培養して $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを製造する方法および該 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを利用してアルドシルフラクトシドを製造する方法を確立した(特願平1-160660号明細書)。しかしながら、該 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを用いたフラクトース含有オリゴ糖の生産に関する報告はない。

(課題を解決するための手段)

すなわち、本発明はアルドースおよびケトースの存在下、ショ糖、ラフィノースおよびスタキオースの中のいずれかに下記の性質を有する $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを作用させることを特徴とするフラクトース含有オリゴ糖の製造法を提供するものである。

(1) 本酵素は受容体として各種単糖、糖アルコール、アルキルアルコール、配糖体、オリゴ糖等の存在下、ショ糖に作用させると、フラクトシル

基を受容体分子に転移させ、その受容体特異性は極めて広い。

(2) 本酵素はショ糖、エルロース、ネオケストース、キシロシクロース、ラフィノース、スタキオースをよく分解するが、1-ケストース、ニストース、イヌロビオース、レバンビオースには作用しにくい。

(3) 本酵素は40℃にてpH 6.5~6.8が至適であり、pH 5.5~10で安定である。

(4) 本酵素はpH 6.5において至適温度は55℃であり、60℃でも70%以上の残存活性を示す。

(5) 本酵素は銀、水銀、亜鉛、銅、錫の存在で阻害を受ける。

(6) 本酵素は分子量52,000 $\pm$ 2,500および58,000 $\pm$ 2,500(SDS-ディスクゲル電気泳動およびゲル濾過法による)の2つからなる。

(7) 本酵素の等電点はそれぞれpH 4.3および4.6(アンフォライン電気泳動法による)である。

本発明で用いる $\beta$ -フラクトフラノシダーゼは微生物を用いて生産され、その生産菌としてはアルスロバクター属に属し、上記性質を有する酵素を生産する能力を有するものであればよく、具体的にはアルスロバクター・エスピー(*Arthrobacter* sp.)K-1とその変異種変異株などがあるが、これら微生物に制限されるものではなく、上記酵素の生産能を有するものであればよい。ここで変異手段としては常法のものでよく、たとえばラジオアイソトープ(RI)、紫外線(UV)、ニトロソグアニジンなどを用いて行えばよい。また、遺伝子組み換え技術を適用することもできる。なお、アルスロバクター・エスピー K-1(FERM P-10736)の菌学的性質の詳細は、特願平1-160660号明細書に記載されている。

上記微生物を培養するための培地としては、炭素源、窒素源等を含有し、微生物が最も効率よく $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを生産することのできる組成の培地であれば、特に制限はない。炭素源としてはショ糖、マルトース、ラクトース、可

溶性澱粉などが好ましく、グルコースのように発酵性の高いものは好ましくない。窒素源としては硝酸塩、アンモニウム塩、酵母エキス、コーン・ステープ・リカーなどが好ましい。その他、マグネシウム塩、カルシウム塩、リン酸塩などの無機塩類や、微生物の生育に必要な栄養物質を培地に適宜加えることができる。最適の培地組成は、1.2%酵母エキス、0.8%ポリペプトン、4%可溶性澱粉、0.4%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>および0.1%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O(pH 7.0)を含むものであるが、供試菌株が目的とする酵素を大量に生産し得る組成を選定すればよい。

本発明で用いる $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを生産するためには、選定した培地に上記微生物を植菌し、pHを中性ないし微アルカリ性、温度20℃から45℃、好ましくは30℃から40℃に保ちつつ、10時間から5日間振盪あるいは通気攪拌培養すればよい。

以上の様にして得られた培養物より酵素は常法により採取、精製できる。たとえば培養物より遠

心分離し、菌体を除いた上清液を粗酵素液として使用できる。さらに、必要に応じて、既知の方法を適当に組合せて精製して使用できる。精製の方法としては、例えば塩析法、疎水クロマトグラフィー法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー法など通常に用いられる手段を挙げることができる。

本発明で用いる $\beta$ -フラクトフラノシダーゼは菌体外酵素であり、培養液に酵素を蓄積する。また、ショ糖による誘導酵素ではなく、培地にショ糖を添加することなく、他の炭素源を用いて培養が可能である。さらに、レバンシュクラゼと異なり培養液中にレバンを生産することがないことから酵素の回収は容易であり、実用的にも有用である。

本発明ではアルドースおよびケトース(受容体分子)の存在下、ショ糖、ラフィノースおよびスタキオース(供与体分子)の中のいずれかに上記の如くして得られる $\beta$ -フラクトフラノシダーゼを作用させてフラクトース含有オリゴ糖を製造す

る。反応を行なうにあたり、本酵素の性質を考慮して目的とするフラクトース含有オリゴ糖の生成量が最大となるような条件を選定すべきである。

ここで受容体分子としては $\beta$ -フラクトフラノシダーゼのフラクトシル基転移反応の受容体となりうるものが望ましい。例えば $\beta$ -フラクトフラノシダーゼのフラクトシル基転移反応によりショ糖若しくはラフィノース以外のアルドシルフラクトシドを新たに生成し得るアルドースであり、すなわちグルコース若しくはメリビオース以外のアルドースである単糖あるいはオリゴ糖が望ましい。たとえばD-キシロース、D-ガラクトース、D-アラビノース、L-アラビノース、L-ソルボース、L-フコース、マルトース、セロビオース、キシロビオース、イソマルトース、ラクトース、マルトトリオース、イソマルトトリオース、パノース、イソパノース等が適している。反応に用いる受容体分子は1つに限らず複数でも可能であり、これらの混合物でもよく、澱粉、アラビノガラクトン、キシラン、キシログルカンの様な多糖類の

部分加水分解物でもよい。

目的とするフラクトース含有オリゴ糖を生成させるためには、その受容体分子と供与体分子とを共存せしめた基質溶液にβ-フラクトフラノシダーゼを反応させればよい。反応時の受容体分子と供与体分子のモル比は1:5から5:1が望ましく、基質濃度は10から50w/w%が望ましい。反応時のpH及び温度はβ-フラクトフラノシダーゼが作用し、フラクトース含有オリゴ糖を生成するような範囲であればよく、pH 5.5から7.0、温度40から60℃の範囲が選ばれる。酵素の添加量は1から50単位/g供与体の範囲で使用され、反応時間は0.1から100時間の範囲が選ばれる。

この様にして製造した反応液は、一般には酵素を加熱失活させ、活性炭脱色、イオン交換樹脂を用いて脱塩、脱色して混合液を得る。更に、活性炭カラムクロマトグラフィーなどのクロマト操作により高純度に精製して目的とするフラクトース含有オリゴ糖を得ることができる。

ラスコに培地を60ml分注し、これに同培地で2日間前培養した種菌を4mlづつ植菌し、37℃で2日間前培養した。これを種菌とし、12ℓの5%コーンステイーブリカー、3%ショ糖、0.4%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O (pH 7.0) となる培地に植菌し、pHを7.0に調整しながら25時間通気攪拌培養した。培養終了後、培養液を遠心分離して菌体を除去し、粗酵素液12ℓを得た。この液の活性はmlあたり140単位であった。

#### 実施例1

ショ糖10gとキシロース10gの混液に、実施例1で得られた粗酵素液をショ糖1gあたり10単位加え固形分濃度を50%(w/w)とし、pHを6.5に調整後、60℃で20時間反応せしめキシロースにフラクトシル基が転移したと思われる転移生成物Aを28%含む反応液を得た。

この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、水洗して単糖を除去したのち、5%エタノールでショ糖を溶出させた。その後、20%エタノール溶出画分を濃縮し、さらに凍結乾燥法に

#### 〔実施例〕

次に、本発明を実施例により説明する。

#### 製造例1

普通寒天斜面培地にアルスロバクター・エスピ-K-1(FERM P-10736)を接種し、37℃で2日間培養後、その1白金耳をとり、1.2%酵母エキス、0.8%ポリペプトン、4%可溶性澱粉、0.4%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O (pH 7.0)の組成からなる液体培地(60ml培地/500ml肩付きラスコ)に植菌し、37℃で2日間通気振盪培養した。これを種菌とし、同組成からなる液体培地に分注し、37℃で2日間通気振盪培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、上清(粗酵素液)を約1.1ℓ得た。本液にはmlあたり30単位のβ-フラクトフラノシダーゼを含有していた。

#### 製造例2

1.2%酵母エキス、0.8%ポリペプトン、4%フラクトース、0.4%(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O (pH 7.0)を培地とし、500ml容坂口フ

より粉末化して純度99%の転移生成物Aを7g得た。該転移生成物Aは、酸加水分解によりフラクトースとキシロースを生成し、サッカロミセス(*Saccharomyces*)を用いたβ-フラクトフラノシダーゼ酵素分解では、フラクトースとキシロースの比が1:1であった。また、該転移生成物Aは還元力はなく、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)の保持時間およびペーパークロマトグラフィーのRf値がレバンシュクラゼを用いて調製した転移生成物と一致した。第1図に該転移生成物Aの<sup>13</sup>C-NMRのスペクトルを示す。

第1図より明らかなように、104.89ppmにフラクトフラノースの2位炭素のβ結合に特有のピークがみられることおよびキシロースのアノメリック炭素はショ糖のグルコースと同様の93.49ppmにピークがみられることから、キシロースの1位はα結合していることが示された。従って、該転移生成物Aは、キシロースにフラクトシル基がβ-2,1結合したキシルシュクロースであることが確認された。

## 実施例 2

ラクトース 5 g とショ糖 5 g を予め水に溶かし、pH を 6.0 とし、製造例 2 で得られた粗酵素液をショ糖 1 g 当り 7.5 単位加え固形分濃度を 40 % (w/w) とし、40 °C で 15 時間反応せしめ転移生成物 B を 30 % 含む反応液を得た。この反応液の高速液体クロマトグラム (カラム: YMC-Pack AQ) を第 2 図に示す。

反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、オリゴ糖をカラムに吸着させ、アルコール濃度を順次高くすることによってオリゴ糖を溶解させ、15 % アルコール画分を濃縮し、活性炭およびイオン交換樹脂を用いて脱色、脱塩後、凍結乾燥を行うことにより純度 98 % の転移生成物 B を 2.7 g 得た。さらに、該転移生成物 B の 1 部を分取用高速液体クロマトグラフィーに供したところ、第 3 図に示したように単一のピークとして得られた。また、該転移生成物 B を加水分解したところ、グルコース、ガラクトース、フラクトースから成ることが示された。 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼ

による加水分解ではラクトースとフラクトースが等モル生成した。第 4 図に該転移生成物 B の  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルを示す。

第 4 図より明らかなように、フラクトースおよびグルコース部分はグルコースの 4 位の炭素以外は、ショ糖の文献値と同様なピークが見られた。また、ガラクトース部分はラクトースの文献値のものと同じケミカルシフトを示した。従って、該転移生成物 B は、フラクトシル基がラクトースのグルコース部分の 1 位に  $\beta$ -2,1 結合したラクトシルフラクトシド (ラクトシュクロース) であることが確認された。

## 実施例 3

以下に示す方法により、ラクトシュクロース生成反応条件の検討を行った。

### (1) ラクトースとショ糖の混合比率の影響

ラクトシュクロースの生成量に及ぼすラクトースとショ糖の混合比率の影響を調べた。ラクトース (0.066 ~ 1.0 g) とショ糖 (0.2 g) を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、製造例 2

で得られた粗酵素液をショ糖 1 g 当り 10 単位加え固形分濃度を 50 % (w/w) とし、40 °C で 20 時間反応せしめ生成物を高速液体クロマトグラフィーで分析した。結果を第 5 図に示す。

第 5 図より明らかなように、ラクトースの混合比率が高いほどフラクトースの生成量は少なく、転移率は高くなるが、固形分あたりのラクトシュクロースの生成量は少なくなった。一方、ショ糖の混合比率が高くなるとフラクトースの生成量は多くなり、転移率は低くなった。ラクトースとショ糖の混合比率を 1 : 1 とした場合、ラクトシュクロース生成量は固形分あたり 30 % と最も高くなった。

### (2) 反応液の固形分濃度の影響

ラクトース 0.2 g とショ糖 0.2 g を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、製造例 2 で得られた粗酵素液をショ糖 1 g 当り 10 単位と水を加え、最終的に固形分濃度が 30 ~ 60 % (w/w) になるように調整した。これを 50 °C で反応せしめ 15 時間および 24 時間後に反応液を分析し、

ラクトシュクロースの生成率を調べた。結果を第 6 図に示す。

第 6 図より明らかなように、固形分濃度が 30 ~ 40 % (w/w) では反応後 15 時間で既に反応は平衡に達し、ラクトシュクロースの生成率は 48 % に達したが、固形分濃度が高くなると反応は遅く、60 % (w/w) では反応後 24 時間でも生成率は 38 % であった。

## 実施例 4

ガラクトース 20 kg とショ糖 10 kg を予め溶解し、pH を 6.5 とし、これに製造例 2 で得られた粗酵素液をショ糖 1 g あたり 10 単位加え固形分濃度を 40 % (w/w) とし、50 °C で 15 時間反応せしめ、ガラクトースにフラクトシル基が転移したと思われる転移生成物 C を 20 % 含有する反応液を得た。

この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーにかけ単糖を除去し、ショ糖を含む純度 85 % の転移生成物 C を 5 kg 得た。次いで、このものをビール酵母由来の  $\alpha$ -グルコシダーゼでショ糖を分

解後、再度活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、純度98%の転移生成物Cを得た。さらに、該転移生成物Cの1部を分取用高速液体クロマトグラフィーにより単一ピークが得られるまで精製し、実施例1と同様に構造を調べた。酸加水分解の結果、構成糖はガラクトースとフラクトースであった。 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼによる酵素分解ではガラクトースとフラクトースの比が1:1であった。また、該転移生成物Cは還元力は示さなかった。該転移生成物Cの $^{13}\text{C}$ -NMRのスペクトルを第7図に示す。

第7図より明らかなように、104.9 ppmにフラクトフラノースの2位炭素の $\beta$ 結合に特有のピークがみられることおよびガラクトースのアノメリック炭素は $\alpha$ 結合していることが示された。従って、該転移生成物Cはガラクトースにフラクトシル基が $\beta$ -2,1結合したガラクトシルフラクトシド(ガルシュクロース)であることが確認された。

ショ糖のグルコース部分の6位の炭素にグルコースが結合していることを示した。従って、該転移精製物Dはイソマルトースにフラクトシル基が $\beta$ -2,1結合したイソマルトシルフラクトシド(イソマルトシュクロース)であることが確認された。

#### 実施例6

マルトース2gとラフィノース2gを予め溶解し、pHを6.5とし、これに製造例2で得られた粗酵素液をラフィノース1g当り10単位添加し固形分濃度を40%(w/w)とし、40℃で15時間反応せしめ、マルトースにフラクトシル基が転移したと思われる転移生成物Eを20%含有する反応液を得た。

この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供し、水洗して単糖を除去したのち、20%エタノールでオリゴ糖を溶出させた。次いで、オリゴ糖画分を分取用高速液体クロマトグラフィーを繰り返すことにより、単一ピークとして転移生成物Eを得た。該転移生成物Eは酸加水分解によりグルコースとフラクトースを生成し、 $\beta$ -フラク

#### 実施例5

実施例2において、ラクトースをイソマルトースに代えたこと以外は実施例2と同様の操作を行い、イソマルトースにフラクトシル基が転移したと思われる転移生成物Dを28%含む反応液を得た。

この反応液を活性炭カラムクロマトグラフィーに供したのち、分取用高速液体クロマトグラフィーにより転移生成物Dを単一ピークで得られるまで精製した。該転移精製物Dは、酸加水分解によりその構成糖はグルコースとフラクトースであることが示され、 $\beta$ -フラクトフラノシダーゼによる酵素分解では等モルのイソマルトースとフラクトースを生成した。また、該転移精製物Dは還元力を示さなかった。該転移精製物Dの $^{13}\text{C}$ -NMRのスペクトルを第8図に示す。

第8図より明らかなように、フラクトース部分のケミカルシフトは文献値のショ糖のフラクトース部分と同じ値を示した。また、2つのグルコースはイソマルトースと同じケミカルシフトを示し、

トフラノシダーゼによる酵素分解ではマルトースとフラクトースを等モル生成した。該転移生成物Eの $^{13}\text{C}$ -NMRのスペクトルを第9図に示す。

第9図より明らかなように、フラクトース部分のケミカルシフトは文献値のショ糖のフラクトース部分と同じ値を示した。また、2つのグルコースはマルトースと同じケミカルシフトを示し、ショ糖のグルコース部分の4位の炭素にグルコースが結合していることを示した。また、該転移生成物Eは既知のエルロースと同じケミカルシフトを示したことから、マルトースにフラクトシル基が $\beta$ -2,1結合したマルトシルフラクトシド(エルロース)であることが確認された。

#### 〔発明の効果〕

本発明によれば、糖転移活性の強い酵素を用いることによってフラクトース含有オリゴ糖を効率よく安価に製造することができる。本発明により得られるキシリシュクロース、イソマルトシュクロースは抗う蝕性の性質を有し、さらにラクトシュクロースはビフィズス菌増殖因子としての活性

を有していることにより、これらのフラクトース含有オリゴ糖は有用な甘味料、機能性食品として実用化が期待される。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、実施例1における転移生成物A（キシルシュクロース）の $^{13}\text{C}$ -NMRのスペクトルを示す。第2図は、実施例2における精製前の転移生成物B（ラクトシュクロース）を含む反応液の高速液体クロマトグラムを示す。第3図は、実施例2において分取用高速液体クロマトグラフィーによって単一転移生成物Bとした高速液体クロマトグラムを示す。第4図は、実施例2における転移生成物B（ラクトシュクロース）の $^{13}\text{C}$ -NMRのスペクトルを示す。第5図は、実施例3におけるラクトシュクロースの生成量とラクトースおよびショ糖の混合比率の関係を示す。第6図は、実施例3におけるラクトシュクロースの生成量と反応液中の固形分濃度の関係を示す。第7図は、実施例4における転移生成物C（ガラクトシルフラクトシド）の $^{13}\text{C}$ -NMRを示す。第8図は、実

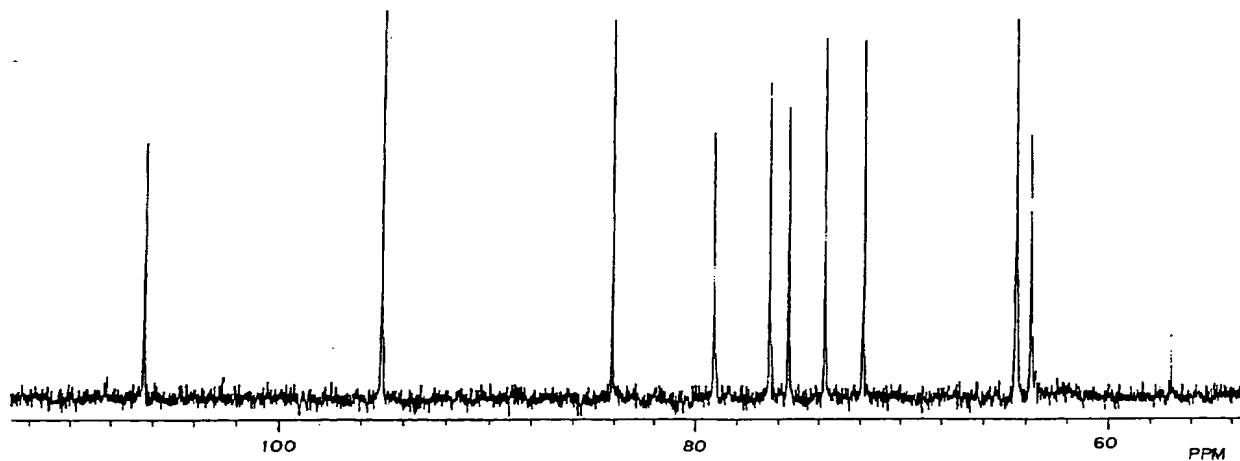
施例5における転移生成物D（イソマルトシルフラクトシド）の $^{13}\text{C}$ -NMRを示す。第9図は、実施例6における転移生成物E（マルトシルフラクトシド）の $^{13}\text{C}$ -NMRを示す。

特許出願人 塩水港精糖株式会社

代理人 弁理士 久保田 藤 郎

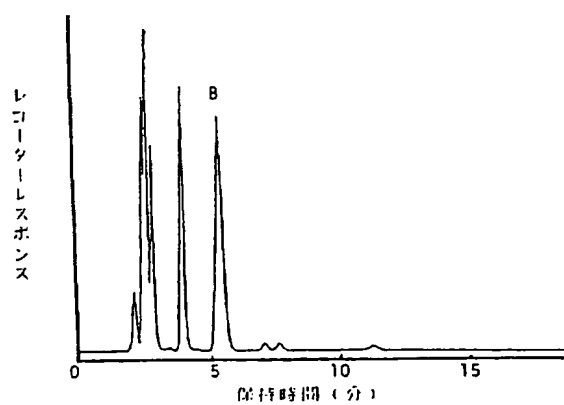


図面の添付(内容に変更なし)

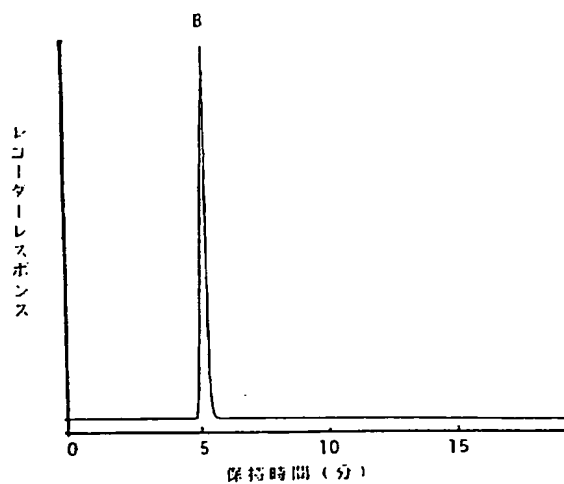


第1図



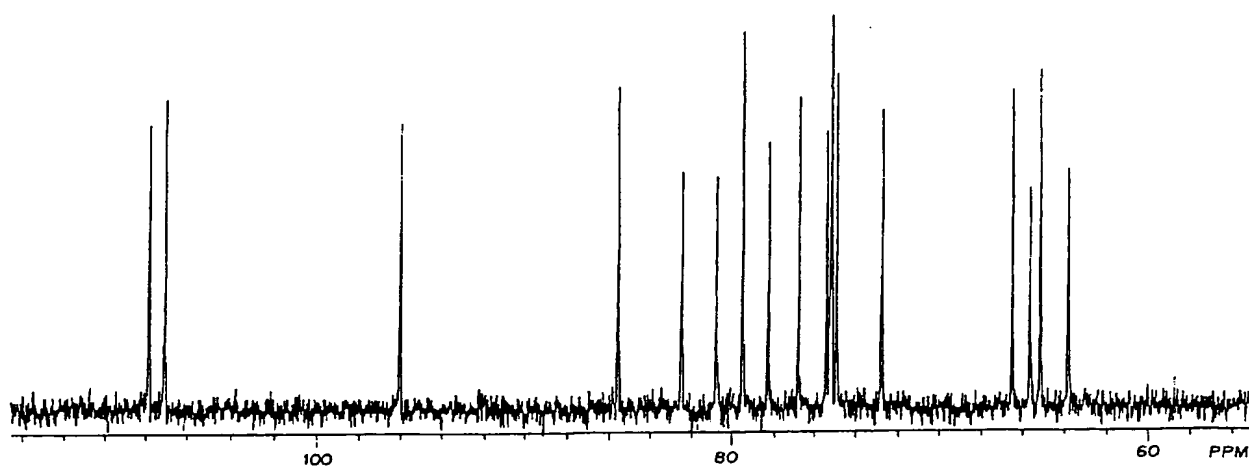


第 2 図

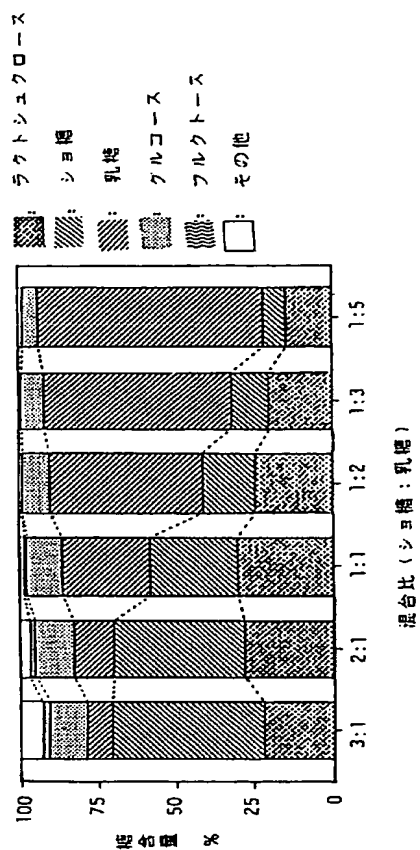


第 3 図

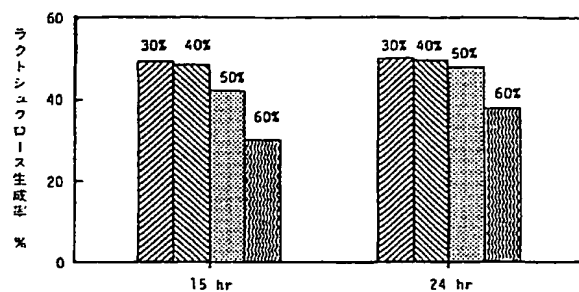
図面の淨書(内容に変更なし)



第 4 図

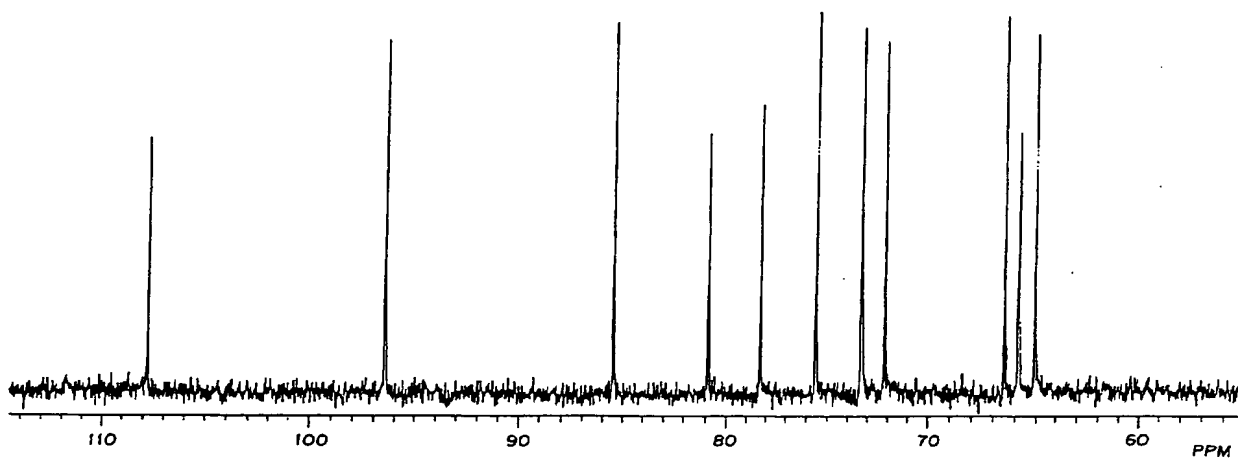


第 5 図



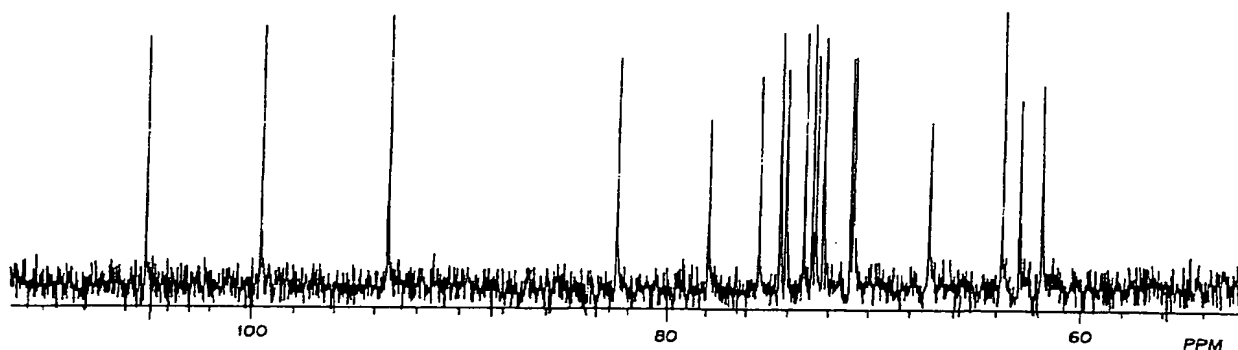
第 6 図

図面の浄書(内容に変更なし)



第 7 図

図面の浄書(内容に変更なし)



第 8 図

図面の浄書(内容に変更なし)

手続補正書(方式)

平成2年11月19日

特許庁長官 植松 敏 殿

1. 事件の表示

特願平2-207582

2. 発明の名称

フラクトース含有オリゴ糖の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

塩水港精糖株式会社

4. 代理人

Ⓐ 104

東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勤ビル5階

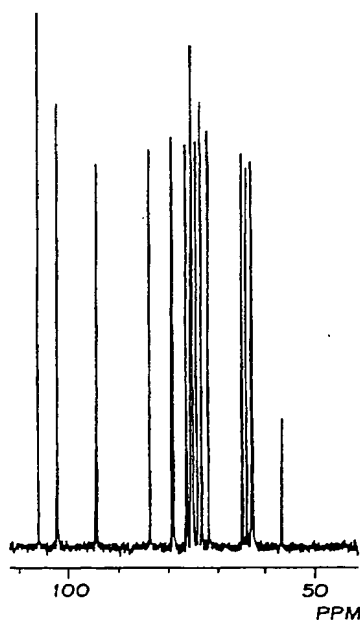
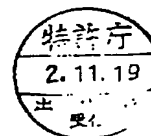
(7407) 弁理士 久保田 藤 郎

電話(275)0721番

5. 補正命令の日付

平成2年10月15日

平成2年10月30日(発送日)



第 9 図

6. 補正の対象

図面

7. 補正の内容

願書に最初に添付した図面(第1, 4, 7~9  
図)の浄書・別紙のとおり(内容に変更なし)

(以上)

手続補正書(自発)

平成3年2月14日

特許庁長官 植松 敏殿

1. 事件の表示

特願平2-207582

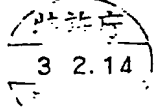
2. 発明の名称

フラクトース含有オリゴ糖の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

塩水港精糖株式会社



4. 代理人

住所 ㊦104 東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勤ビル5階

氏名(7407) 弁理士 久保田 藤 郎

電話(3275)0721番



5. 補正の対象

明細書の特許請求の範囲の欄及び発明の詳

細な説明の欄

6. 補正の内容

(1)特許請求の範囲を別紙の通りに訂正する。

方式  
審査 市川 特

(2)明細書第4頁6~7行目の「キシロシルフラ  
クトシド」を「キシルシュクロース」に訂正する。

(3)同第4頁8行目の「ラクトシルフラクトシド」  
を「ラクトシュクロース」に訂正する。

(4)同第5頁4行目の「FERM P-10736」を「FERM B  
P-3192」に訂正する。

(5)同第5頁12行目の「および」を「または」  
に訂正する。

(6)同第6頁13行目の「銀、水銀、亜鉛、銅、  
錫」を「銀、水銀、亜鉛、銅および錫の中から選  
ばれた金属のイオン」に訂正する。

(7)同第7頁13行目の「FERM P-10736」を「FERM  
BP-3192」に訂正する。

(8)同第9頁16行目の「および」を「または」  
に訂正する。

(9)同第12頁5行目の「FERM P-10736」を「FERM  
BP-3192」に訂正する。

(10)同第13頁2行目の「種菌」を「種菌(実施  
例)と同じ)」に訂正する。

(以上)

特許請求の範囲

1. アルドースまたはケトースの存在下、ショ糖、  
ラフィノースおよびスタキオースの中のいずれか  
に下記の性質を有するβ-フラクトフラノシダー  
ゼを作用させることを特徴とするフラクトース含  
有オリゴ糖の製造法。

(1) 本酵素は受容体として各種単糖、糖アルコ  
ール、アルキルアルコール、配糖体、オリゴ糖等  
の存在下、ショ糖に作用させると、フラクトシル  
基を受容体分子に転移させ、その受容体特異性は  
極めて広い。

(2) 本酵素はショ糖、エルロース、ネオケスト  
ース、キシルシュクロース、ラフィノース、スタ  
キオースをよく分解するが、1-ケストース、ニ  
ストース、イヌロビオース、レバンビオースには  
作用しにくい。

(3) 本酵素は40℃にてpH6.5~6.8が至  
適であり、pH5.5~10で安定である。

(4) 本酵素はpH6.5において至適温度は55  
℃であり、60℃でも70%以上の残存活性を示

す。

(5) 本酵素は銀、水銀、亜鉛、銅および錫の中から選ばれた金属のイオンの存在で阻害を受ける。

(6) 本酵素は分子量  $52,000 \pm 2,500$  および  $58,000 \pm 2,500$  (SDS-ディスクゲル電気泳動およびゲル濾過法による) の2つからなる。

(7) 本酵素の等電点はそれぞれ pH4.3 および 4.6 (アンフォライン電気泳動法による。) である。

2. フラクトース含有オリゴ糖が請求項1記載の酵素の受容体となり得るアルドースまたはケトースを含むものである請求項1記載の方法。

3. フラクトース含有オリゴ糖がキシリシュクロース、ガルシュクロース、ラクトシュクロース、イソマルトシュクロース、エルロース、アラビノシルフラクトシド、フコシルフラクトシドおよびソルボシルフラクトシドの中のいずれかである請求項2記載の方法。

# 受託番号変更届

平成3年2月14日

特許庁長官 植松 敏殿

## 1. 事件の表示

特願平2-207582

## 2. 発明の名称

フラクトース含有オリゴ糖の製造法

## 3. 手続をした者

事件との関係 特許出願人

塩水港精糖株式会社

## 4. 代理人

〒104 東京都中央区京橋1丁目1番10号

西勤ビル5階

(7407) 弁理士 久保田 慶 郎

電話 (3275) 0721 番

## 5. 旧寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

## 6. 旧受託番号

FERM P-10736

方式  
審査 (市川)



## 7. 新寄託機関の名称

工業技術院微生物工業技術研究所

## 8. 新受託番号

FERM BP-3192

## 9. 添付書類の目録

新受託番号を証明する書面 1通

(以上)